Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 830-843

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 843-830

# بهینه‌سازی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی نوشیدنی پروبیوتیک لیمویی تولید شده بر پایه تراوه

رضا امیر خمیریان[1]- حسین جوینده[2]*- جواد حصاری[3]- حسن برزگر[4]

تاریخ دریافت: 1394/08/30
تاریخ پذیرش: 1394/12/08

## چکیده

امروزه به‌دلیل تقاضای روبه‌رشد فراورده‌های آب‌پنیر بویژه کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر (WPC) و پروتئین ایزوله آب‌پنیر (WPI)، مقدار قابل توجهی تراوه تولید می‌گردد که دفع آن آلودگی محیط‌زیست را به‌دنبال دارد. تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک از تراوه می‌تواند به‌عنوان راه‌حلی مناسب برای جلوگیری از هدر رفتن تراوه و تولید نوشیدنی‌های ارزان قیمت با خواص تغذیه‌ای مناسب مورد توجه قرار گیرد. هدف از این مطالعه بهینه‌یابی فرمولاسیون نوشیدنی لیمویی تولید شده برپایه تراوه با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی و تولید نوشیدنی پروبیوتیک از نوشیدنی بهینه می‌باشد. مطابق نتایج آزمون‌های ابتدایی، مقادیر تراوه (12/95-97/04 ml)، آب (19/77-70/22 ml) و کنسانتره لیمو (5/59-16/04 g) به‌عنوان متغیرهای ثابت آزمایش تعیین و تأثیر آن‌ها بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، ماده خشک و بریکس) و حسی (مزه، رنگ، بو، پس مزه و پذیرش کلی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بهینه‌سازی نشان داد که بهترین خصوصیات زمانی حاصل می‌شود که فرمولاسیون نوشیدنی شامل 50/63 ml آب، 30 ml تراوه و 10/67 g کنسانتره لیمو باشد. در ادامه، نوشیدنی بهینه پس از پاستوریزاسیون با باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تلقیح شد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، حسی و میکروبی آن در مدت 28 روز نگهداری در دمای 4°C بررسی گردید. نتایج نشان داد که طی نگهداری امتیازات حسی و pH محصول کاهش یافت درحالی‌که تغییرات ماده خشک و بریکس نوشیدنی معنی‌دار نگردید. تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در پایان مدت نگهداری 6/95 log cfu/ml و مقادیر فنل کل (برحسب اسید گالیک) 12/98 mg/100g، خواص آنتی‌اکسیدانی 0/82 μmol/g برحسب ترولکس و 1/79 μmol/g برحسب آهن II و مقدار ویتامین C نوشیدنی 8/32 mg/100g تعیین گردید.

**واژه‌های کلیدی:** تراوه، باکتری‌های پروبیوتیک، نوشیدنی میوه‌ای لیمویی، روش سطح پاسخ

## مقدمه

یکی از روش‌های تولید پنیر استفاده از سیستم فراپالایش می‌باشد. در طی عمل فراپالایش یا اولترافیلتراسیون، شیر یا آب پنیر به دو جزء رتنتیت یا ناتراوه و پرمیت یا تراوه تبدیل می‌شود. تراوه به‌عنوان محصول جانبی در هنگام تولید فراورده‌های آب پنیر همانند ایزوله پروتئینی آب پنیر (WPI) و پروتئین آب پنیر تغلیظ شده (WPC) از شیر یا آب پنیر و با کمک فرایند فراپالایش تولید می‌گردد. ترکیب تراوه عمدتاً شامل آب، لاکتوز، املاح و مقادیر جزیی چربی و پروتئین می‌باشد (Beucler *et al*, 2005). اکثراً تراوه تولید شده یا به‌عنوان خوراک دام مصرف شده و یا دفع می شود. تنها در ایران سالانه 251000 تن پنیر به روش فراپالایش تولید می‌شود که مقدار تراوه حاصل از آن حدود 1000000 تن در سال است (جوکار و همکاران، 1385). با توجه به حجم بالای تراوه تولید شده، در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی به‌منظور جلوگیری از هدر رفت این ماده غذایی با ارزش انجام گرفته است. برتری مهم تراوه نسبت به آب پنیر کارخانجاتی که با روش‌های غیر UF پنیر تولید می‌کنند، این است که لاکتوز را می‌توان به‌صورت دست نخورده حفظ کرد (Sinha *et al*, 2007). از جمله موارد پیشنهادی در زمینه بکارگیری تراوه، تولید لاکتوز و اسیدهای آلی به‌ویژه اسیدلاکتیک و اسید استیک است که مصارف زیادی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و پلیمری دارند. (Panesar *et al*, 2007). همچنین می‌توان تراوه را به‌وسیله روش‌های خشک کردن به پودر تبدیل نمود و در صنایع غذایی همانند شیرینی‌پزی، قنادی و شکلات‌سازی مورد استفاده قرار داد (Garcia *et al*, 2002). تبدیل لاکتوز موجود در تراوه به

1، 2و 4-به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاثانی، خوزستان.
3- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.
(* - نویسنده مسئول (Email: hosjooy@yahoo.com
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.51593

مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده آن با استفاده از آنزیم بتاگالاکتوزیداز در محیط فرمانتور (Leiva & Guzman, 1995) و تولید نوشیدنی الکترولیت به‌عنوان نوشیدنی‌های عملگرا (Beucler *et al*, 2005) از دیگر پیشنهادات ارایه شده در این زمینه است. به‌نظر می‌رسد که تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک از تراوه نیز می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب در بکارگیری تراوه مورد توجه قرارگیرد.

امروزه مصرف شیر و فرآورده‌های آن به‌عنوان یکی از شاخص‌های توسعه جوامع انسانی مطرح است و همبستگی بالایی بین سطح مصرف فرآورده‌های لبنی و سطح سلامتی افراد جامعه به‌لحاظ کارایی و ضریب هوشی، میزان ابتلا به بیماری‌های عفونی و پیشگیری از پوکی استخوان وجود دارد. در این میان، نوشیدنی‌های لبنی بخش عمده‌ای از محصولات لبنی را به‌خود اختصاص داده و به دلیل اهمیت های تغذیه‌ای مورد توجه ویژه قرار دارند (Bylund, 2003). پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که مصرف منظم و کافی آنها با بهبود خواص میکروبی روده، واجد آثار سودمندی بر سلامت مصرف‌کننده است (Sanders, 2003). مصرف گونه‌های پروبیوتیک دارای اثرات سلامتی‌بخشی نظیر کمک به هضم لاکتوز، کنترل کلسترول سرم خون، کنترل سرطان و یا بیماری‌های عفونی دستگاه گوارش است. برای تحقق این آثار سلامتی‌بخش مصرف منظم $10^6$الی $10^9$ سلول زنده این باکتری توصیه می‌شود. مصرف محصولات لبنی تخمیری حاوی کشت‌های بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس در استقرار دوباره این ارگانیسم‌ها در روده کمک می‌کند و در نتیجه از رشد باکتری‌های مضر جلوگیری کرده و باعث افزایش ویژگی‌های درمانی محصول می‌شود (Kop-Hoolihan, 2001).

در تولید نوشیدنی استفاده از یک پایدارکننده به‌منظور تثبیت سیستم کلوئیدی نوشیدنی و جلوگیری از رسوبات حاصل از فرایندهای حرارتی ضروری می‌باشد (جوکار و همکاران، 1385). بدین منظور می‌توان از مخلوط تثبیت‌کننده صمغ عربی- سدیم کازئینات استفاده نمود (Ye *et al*, 2012). همچنین استفاده از تثبیت کننده‌های دیگر مانند پکتین و سایر ترکیبات فعال سطحی به منظور جلوگیری از ترسیب پروتئین ها پیشنهاد گردیده است (Sodini *et al*, 2006). امروزه با توجه به آگاهی مردم نسبت به نقش رژیم غذایی در سلامت افراد، تولید غذاهای با میزان کالری پایین، افزایش پیدا کرده است. از این رو ترکیبات شیرین‌کننده متنوعی به‌عنوان جایگزینی شکر و تولید محصولات با میزان کالری کمتر مطرح شده است. استویا یکی از این شیرین کننده‌های غیرکالری‌زا است که دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضددیابتی، ضداسهال، ضدهایپرگلایسمی، ضدفشارخون، ضدتومور و ادرارآور می‌باشد (Shivanna *et al*, 2013). بنابراین می‌توان جهت تولید نوشیدنی عملگرا با ارزش تغذیه‌ای بالا و کالری پایین از استویا به‌عنوان شیرین‌کننده غیرکالری‌زا استفاده نمود.

حجم زیاد استقبال از محصولات لبنی موجب گردیده است تولیدکنندگان صنایع لبنی تلاش دو چندانی برای ایجاد تنوع در فرمولاسیون محصولات انجام دهند. در این پژوهش سعی بر آن بوده است تا نوشیدنی پروبیوتیک لیمویی نسبتاً ارزان با خواص حسی مطلوب و خصوصیات تغذیه‌ای و عملکردی بالا برای عموم مصرف‌کنندگان تولید شود.

## مواد و روش‌ها

تراوه مورد استفاده از تولید پنیر فراپالایش از شرکت شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی و کنسانتره لیمو از شرکت تکدانه مرند تهیه شد. به‌منظور تثبیت سیستم کلوئیدی نوشیدنی حاصل و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در محیط اسیدی و در اثر فرایند حرارتی، مخلوط صمغ عربی (Norevo، آلمان)- سدیم کازئینات (Altroika، ترکیه) براساس آزمون‌های مقدماتی به‌ترتیب به مقدار 0/2 و 0/5 درصد وزنی/ حجمی انتخاب و جهت تولید نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت شیرین کردن نوشیدنی و پوشاندن طعم و مزه تراوه، مخلوط شکر سفید- استویا براساس آزمون‌های مقدماتی به‌ترتیب به مقدار 2 و 0/02 درصد وزنی/ حجمی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از تری سدیم فسفات (تهران اسید، ایران) به مقدار 0/8 درصد جهت نزدیک نمودن pH نوشیدنی به pH اپتیمم پروبیوتیک (6 -5/5) مصرفی و کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر (پگاه آذربایجان شرقی) به میزان 1 درصد جهت بهبود خواص تغذیه‌ای و احساس دهانی استفاده شد.

### تهیه نوشیدنی میوه‌ای پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک

در این پژوهش، برای تهیه نوشیدنی‌ها از سطوح مختلف تراوه، کنسانتره و آب استفاده شد (جدول 1). تولید نوشیدنی‌های میوه‌ای بر پایه تراوه بر اساس روش پیشنهادی توسط Beucler و همکاران (2005) پس از اعمال تغییرات لازم در روش تولید و فرمولاسیون صورت پذیرفت. برای تولید نوشیدنی ابتدا استویا، شکر، مخلوط صمغ عربی- سدیم کازئینات، WPC و فسفات خوراکی با هم به‌خوبی مخلوط و در مقدار مناسبی آب محلول گردیدند. پس از یک روز نگهداری، تراوه و کنسانتره لیمو به این مخلوط اضافه و با همزن مکانیکی (Finetech، کره جنوبی) مجدداً مخلوط به‌خوبی همگن گشت. در پایان، نوشیدنی در بن ماری در دمای 80°C به مدت 5 دقیقه پاستوریزه شده و پس از رساندن به دمای محیط (20°C) آزمون‌های مورد نظر روی آن انجام شد. برای تهیه نمونه‌های پروبیوتیک علاوه بر مراحل فوق، پس از پاستوریزاسیون و سرد شدن

تا دمای محیط، مقدار یک درصد از شیر پس‌چرخ حاوی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* اضافه گردید و سپس نمونه‌ها در بطری‌های پلی‌اتیلنی 200 میلی‌لیتری پر شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای4°C نگهداری شدند. کلیه آزمون‌های شیمیایی و حسی جهت بهینه‌سازی تولید نمونه بلافاصله پس از تولید انجام گرفت. در مرحله بعد و جهت مقایسه نوشیدنی‌های پروبیوتیک با غیرپروبیوتیک، تمامی آزمون‌های شیمیایی، میکروبی و حسی پس از تولید و پس از 7، 14، 21 و 28 روز نگهداری انجام شدند.

**جدول 1- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده از آنها در طرح سطح پاسخ[1]**

| نوع متغیر | واحد | نماد ریاضی | سطوح کدبندی شده متغیر | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | +1/682 | +1 | 0 | -1 | -1/682 |
| **تراوه** | ml | $X_1$ | 97/04 | 80 | 55 | 30 | 12/9552 |
| **آب** | ml | $X_2$ | 70/22 | 60 | 45 | 30 | 19/7731 |
| **کنسانتره** | g | $X_3$ | 16/04 | 14 | 11 | 8 | 5/9546 |

[1]شش تکرار در نقطه مرکزی برای تخمین مجموع خطای کامل مربع ها به کار گرفته شد.

**تهیه کشت پروبیوتیک**

در این پژوهش از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 (خشک شده انجمادی از نوع DVS[1]، شرکت Chiristian Hansen دانمارک) به‌عنوان سویه پروبیوتیک استفاده شد. میزان تلقیح پروبیوتیک‌ها به شکلی انجام پذیرفت که تعداد اولیه آنها در نوشیدنی‌ها و در شروع زمان نگهداری بیش از $10^9$ cfu/ml باشد. برای این منظور، یک لیتر شیر پس‌چرخ در دمای90°C به مدت 15 دقیقه حرارت داده شد و پس از سرد شدن به دمای 37°C، مقدار 25 گرم پودر DVS حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به آن اضافه گردید. سپس شیر پس چرخ مذکور با مقادیر مختلف 0/1، 0/25، 0/5، 0/75 و 1 درصد به نمونه‌های نوشیدنی پروبیوتیک اضافه شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان یک درصد تلقیح برای رسیدن به تعداد حداقل زنده‌مانی مورد نظر ($>10^9$) انتخاب گردید، به‌طوری که هر میلی‌لیتر شیر پس‌چرخ مذکور حاوی logcfu/ml 0/84± 11/91 باکتری پروبیوتیک LA5 بود. نوشیدنی‌ها پس از تلقیح، بدون انجام تخمیر به سرعت به یخچال منتقل و نگهداری شدند.

**آزمون‌های فیزیکوشیمیایی**

اسیدیته تراوه بر حسب اسید لاکتیک و نوشیدنی میوه‌ای برحسب اسید سیتریک به روش تیتراسیون با محلول سود در حضور معرف فنل‌فتالئین، pH توسط pHمتر دیجیتال (knick، 766، آلمان)، مواد جامد محلول با استفاده از رفراکتومتر دستی ATAGO (ژاپن)، ماده خشک به روش تبخیر در آون، خاکستر به روش سوزاندن در کوره الکتریکی، پروتئین به روش کلدال (ضریب تبدیل: 6/38) و چربی به روش ژربر اندازه گیری شد (AOAC, 2005). اندازه‌گیری فنل کل (Singleton & Rossi, 1965)، تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برحسب ترولکس (Re *et al*, 1999) و کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی آهن II (Song *et al*, 2010) توسط اسپکتوفتومتر HACH (ساخت آمریکا) انجام شد. اندازه‌گیری ویتامین C نیز به روش یدومتری (Cesar *et al*, 1999) انجام پذیرفت.

**رنگ**

عکس‌برداری با استفاده از دوربین دیجیتالی(Finepix A202، Fujifilm، چین) تعبیه شده در محفظه چوبی استاندارد موجود در دانشگاه تبریز انجام شد و فاکتورهای مربوط به رنگ (L، a وb)، با انتقال تصاویر به رایانه و اندازه‌گیری 5 نقطه توسط نرم‌افزار فتوشاپ به‌دست آمدند (Yam and Papadakis, 2004).

**آزمون‌های میکروبی**

به‌منظور تأیید کیفیت میکروبی نوشیدنی‌های پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک، تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، کلی فرم و کپک و مخمر بلافاصله پس از تولید و پس از 7، 14، 21 و 28 روز بررسی گردید (Krishnaiah *et al*, 1989). زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها نیز در فواصل زمانی مذکور مطابق با روش Mortazavian و همکاران (2007) ارزیابی شد.

**ارزیابی حسی**

پس از برگزاری آزمون‌های حسی مقدماتی و قرار دادن یک نمونه تکراری میان سه نمونه نوشیدنی در هر بار آزمون، در نهایت 10 نفر داور که بیشترین دقت در ارزیابی و تشخیص نمونه‌های مشابه

1 Direct Vat Set

برخوردار بودند، برای ارزیابی حسی انتخاب شدند. 70–60 میلی‌لیتر از هر نمونه نوشیدنی با دمای 2°C± 10 در اختیار داوران (مهندسـان و کارکنان شرکت پگاه آذربایجان شرقی و دانشجویان صنایع غـذایی) قرار داده شد. آزمون حسی مطابق روش هدونیک 5 نقطه‌ای (بسـیار مطلوب تا بسیار نامطلوب) انجام گرفت و صفات مزه، رنگ، بو، پـس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی توسط داوران مورد بررسی قـرار گرفـت. سپس داده‌های کیفی (غیرپارامتریک) به داده‌های کمی (پارامتریـک) تبدیل شد، به این ترتیب که به‌عبارت بسیار نامطلوب تا بسیار مطلوب، امتیاز 1 تا 5 داده شد. نوشیدنی‌هـای تولیـد شـده در سـایر روزهـای نگهـداری بـه روش مـذکور تحـت ارزیـابی حسـی قـرار گرفـت (Meilgaard *et al*, 2006).

### طرح آزمایشی RSM

در این پژوهش برای برآورد تأثیر متغیرهای مستقل تـراوه ($X_1$)، میزان کنسانتره ($X_2$) و آب ($X_3$)، بر متغیرهای وابسـته (شـامل pH، اسیدیته، ماده خشک، بریکس، رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی) از روش سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده شد (جدول 1). تعداد 20 آزمایش با توجه به طرح مرکب مرکزی (CCD) انجـام گردید (جدول 2).

**جدول 2- تیمارهای تصادفی آزمایش براساس متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی**

| تیمار | آب | تراوه | کنسانتره |
|---|---|---|---|
| 1 | 45 | 55 | 11 |
| 2 | 30 | 30 | 14 |
| 3 | 60 | 30 | 14 |
| 4 | 45 | 12/95 | 11 |
| 5 | 70/22 | 55 | 11 |
| 6 | 19/77 | 55 | 11 |
| 7 | 60 | 80 | 14 |
| 8 | 45 | 97/04 | 11 |
| 9 | 60 | 80 | 8 |
| 10 | 45 | 55 | 11 |
| 11 | 45 | 55 | 11 |
| 12 | 30 | 80 | 8 |
| 13 | 60 | 30 | 8 |
| 14 | 45 | 55 | 16/04 |
| 15 | 45 | 55 | 11 |
| 16 | 45 | 55 | 11 |
| 17 | 45 | 55 | 11 |
| 18 | 30 | 80 | 14 |
| 19 | 45 | 55 | 5/95 |
| 20 | 30 | 30 | 8 |

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری نمونه‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ و با نرم‌افـزار Design Expert (نسخه 9) انجام شد. این طرح، دربرگیرنده گروهی از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که امکـان رسـیدن بـه شـرایط بهینه در سیستم‌های پیچیـده را فـراهم مـی‌کنـد. بـا کـاربرد آنـالیز رگرسیون شاخص‌های اندازه‌گیری شده درقالـب یـک چنـد جملـه‌ای درجه دوم بر طبق معادله زیر مدل‌سازی شدند.

$$Y= \beta_0+ \beta_1x_1+ \beta_2x_2+ \beta_3x_3+ \beta_{11}x_1^2+ \beta_{22}x_2^2+ \beta_{33}x_3^2+ \beta_{12}x_1x_2+ \beta_{13}x_1x_3+ \beta_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

که در آن y پاسخ‌های مختلف و $\beta_0$ ضرایب ثابت مدل‌ها اسـت. ($\beta_1$, $\beta_2$, $\beta_3$)، ($\beta_{11}$, $\beta_{22}$, $\beta_{33}$) و ($\beta_{12}$, $\beta_{13}$, $\beta_{23}$) به ترتیـب نشـان‌دهنـده اثرخطی، درجه دوم و برهمکنش مـدل پیشـنهادی بـه‌وسـیله آنـالیز چندگانه رگرسیون می‌باشد. $x_1$، $x_2$ و $x_3$ متغیرهای مستقل می‌باشند. پس از به‌دست آمدن نمونه بهینه، داده‌ها با استفاده نـرم‌افـزار SPSS ویرایش 20 به روش طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## 3-بحث و نتایج

جدول 3 ترکیبات تراوه و کنسانتره لیمو مـورد اسـتفاده در تهیـه

نوشیدنی لیمویی را نشان می‌دهد. در این تحقیق از تـراوه حاصـل از فرایند تولید پنیر سفید ایرانی فراپالوده استفاده گردیـد. همـانطور کـه مشاهده می‌شود، اگرچه در مقایسه با آب پنیر مقدار پروتئین و چربـی تراوه پایین‌تر است، اما همانند آب پنیر، بخش اعظم لاکتوز و امـلاح شیر به تراوه راه می‌یابد. بدین‌ترتیـب تـراوه قـادر بـه فـراهم آوردن محیطی مساعد برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک است.

**جدول -3 ترکیبات تراوه و کنسانتره مورد استفاده در تولید نوشیدنی لیمویی**

| ماده | pH | اسیدیته (%) | موادجامد محلول (BX) | ماده خشک (%) | خاکستر (%) | چربی (%) | پروتئین (%) | قند (g/100 ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| تراوه | 0/33±0/04 | 7/25±0/25 | - | 5 ±0/1 | 0/46±0/06 | 0/075±0/025 | 0/39±0/07 | 4/11±0/28 |
| کنسانتره لیمو | 2/3±0/5 | 25±4/39 | 39±1/86 | - | 0/36± 0/05 | - | - | 8±0/37 |

**مدل‌سازی**

با استفاده از این روش آماری برای هر پاسخ یک معادلـه درجـه دوم به دست آمد. جدول 4 ضرایب رگرسیون مدل‌ها برای پاسخ‌های مختلف و سایر خصوصیات مدل ارائـه شـده را نشـان مـی‌دهـد. بـا جایگزینی متغیرهای مستقل در معادله، می‌توان مقدار هر پاسـخ یـا متغیرهای وابسته را پیشگویی کرد.

**جدول -4 ضرایب رگرسیون مدل‌های چند جمله برای پاسخ‌های مختلف**

| ضرایب | pH | اسیدیته | بریکس | ماده خشک | رنگ | مزه | بو | پس مزه | پذیرش کلی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\beta_0$ | 5/03 | 1/67 | 12/11 | 13/01 | ns | 3/90 | 3/86 | 3/96 | 4/12 |
| $\beta_1$ | 0/20 | -0/19 | -0/52 | -0/47 | ns | -0/098 | 0/1 | ns | ns |
| $\beta_2$ | 0/34 | -0/32 | -0/34 | -0/27 | ns | -0/17 | ns | ns | ns |
| $\beta_3$ | -0/40 | 0/35 | 0/51 | 0/59 | ns | -0/26 | 0/52 | -0/21 | -0/27 |
| $\beta_{12}$ | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | -0/31 | ns |
| $\beta_{13}$ | ns | ns | ns | ns | ns | -0/19 | ns | ns | ns |
| $\beta_{23}$ | ns | ns | ns | ns | ns | 0/14 | ns | 0/19 | 0/16 |
| $\beta_{11}$ | ns | ns | ns | ns | ns | -0/33 | ns | -0/47 | -0/27 |
| $\beta_{22}$ | -0/011 | ns | ns | ns | ns | -0/19 | ns | -0/24 | -0/23 |
| $\beta_{33}$ | -0/029 | -0/069 | ns | ns | ns | -0/42 | ns | -0/47 | -0/53 |
| $R^2$ | 0/9953 | 0/9934 | 0/9877 | 0/9900 | 0/6971 | 0/9651 | 0/9552 | 0/9602 | 0/9616 |
| Adj-$R^2$ | 0/9911 | 0/9874 | 0/9854 | 0/9881 | 0/4245 | 0/9336 | 0/9469 | 0/9244 | 0/9271 |
| value F | 273/30 | 166/72 | 428/55 | 527/47 | 2/56 | 30/68 | 113/83 | 26/82 | 28/83 |
| p-value | <0/0001 | <0/0001 | <0/0001 | <0/0001 | 0/0799 | <0/0001 | <0/0001 | <0/0001 | <0/0001 |

ns، در سطح 5% معنی دار نمی باشد.

یافته‌های آماری نشان داد که متغییرهای مستقل (مقـادیر آب، تراوه و کنسانتره) اثر معنی‌داری (P<0/05) بر پارامترهای اندازه‌گیری شده داشتند. امتیازات مزه، پذیرش کلی و پس مزه با افزایش مقـدار آب و تراوه به‌ترتیب تا حدود 45 و 55 میلی‌لیتر افـزایش پیـدا کـرد. افزایش کنسانتره تا حدود 11 گرم امتیازات مزه، پذیرش کلی و پس مزه را افزایش داد. همچنین با افزایش تراوه و آب مقـادیر اسـیدیته، بریکس، ماده خشک و امتیاز بو و پذیرش کلی کاهش پیدا کرد اما pH افزایش یافت.

**بهینه‌سازی فرمولاسیون نوشیدنی**

جهت بهینه سازی فرمولاسیون نوشیدنی، 20 فرمـول مختلـف نوشـیدنی (جـدول2) تهیـه شـد و بـا اسـتفاده از آزمـون‌هـای فیزیکوشـیمیایی و حسـی مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت. بـه‌منظـور بهینه‌سازی پارامترهای اندازه‌گیری شده pH، اسیدیته و ماده خشک

در محدوده داده‌های به‌دست آمده، بریکس در نوشیدنی لیمـویی در مقدار 12/2 و همه ارزیابی‌های حسـی در بیشـترین مقـدار انتخـاب شدند. همچنین متغیرهای مستقل شامل آب، تـراوه و کنسـانتره در محدوده داده‌های به دست آمده تعریف شـدند. بـرای تعیـین اعتبـار نتایج حاصل از مدل، آزمایش‌ها تحت شرایط بهینه با 3 تکرار انجام شد. نتایج آزمایشات تجربی با نتایج حاصل مدل اختلاف معنی‌داری نداشتند و بنابراین مدل ارائه شده توسط نـرم‌افـزار مـی‌توانـد بـرای تخمین نتایج در شرایط عملی قابل کاربرد باشد (جدول 5).

**جدول -5 مقایسه نتایج پیش‌بینی شده و نتایج حاصل از آزمایش نمونه بهینه نوشیدنی لیمویی برپایه تراوه**

| نمونه | آب ml | تراوه ml | کنسانتره g | pH | اسیدیته % | موادجامد محلول (Bx) | ماده خشک % | رنگ | مزه | بو | پس مزه | پذیرش کلی | مقبولیت |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نتیجه بهینه | 50/63 | 30 | 10/67 | 4/78 | 1/87 | 12/20 | 13/03 | 4/28 | 3/82 | 3/89 | 3/93 | 3/99 | 0/799 |
| نتیجه نمونه آزمایشی تولید شده | | | | 4/81 ±0/4 | 1/86 ±0/09 | 12/26 ±0/8 | 13/19 ±0/8 | 4/33 ±0/35 | 4 ±0/3 | 3/95 ±0/28 | 4 ±0/3 | 4/13 ±0/4 | |

## خصوصیات فیزیکوشیمیایی نوشیدنی لیمویی طی نگهداری

نمونه‌های بهینه تولید شده دارای میزان ماده خشک، پـروتئین و خاکستر بیشتری در مقایسه با نمونه‌های تجاری مانند ریولا بودنـد. (Holsinger *et al*, 1974). همانطورکه نتایج جدول 6 نشان می‌دهد، تغییرات پارامترهای pH، بریکس و مـاده خشـک در طـی نگهـداری نوشیدنی بهینه غیرپروبیوتیک، معنی‌دار نبود که دلیل آن عدم فعالیت میکروبی و کاهش قابل ملاحظه سرعت واکـنش‌هـای شـیمیایی در دمای یخچال می‌باشد (İçier *et al*, 2015). Sampedro و همکاران (2009) ، در بررسی اثر فرآیند حرارتی (85 درجه سانتی‌گراد به مدت 66 ثانیه) بر خصوصیات نوشیدنی شیر- آب پرتقال نتایج مشـابهی را گـزارش نمودنـد. نوشـیدنی بـه مـدت 4 هفتـه در دمـای 10°C-8 نگهداری شد و در هفته آخر نگهداری کـاهش انـدک pH بـه دلیـل افـزایش جمعیـت میکروبـی مشـاهده گردیـد. pH نوشـیدنی‌هـای پروبیوتیک برخلاف نوشیدنی‌های فاقد پروبیوتیک، طی مـدت زمـان نگهداری کاهش معنی‌داری پیدا کرد، احتمالاً فعالیـت بـاکتری‌هـای پروبیوتیک از دلایل این کاهش می‌باشـد (Pescuma *et al*, 2010). pH نوشیدنی پروبیوتیک در طول نگهداری از مقدار 4/81 در ابتدا بـه 4/42 در انتها کاهش یافـت. بـا ایـن حـال، اخـتلاف معنـی‌داری در تغییرات بریکس و ماده خشک نوشیدنی‌هـای بهینـه پروبیوتیـک در طول نگهداری ملاحظه نگردید. Mohamed و همکاران (2014)، در بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و میکروبی نوشیدنی پاپایا طی مدت30 روز نگهداری در دمای یخچـال (4°C) ، نتـایج مشـابهی را گـزارش نمودند. این پژوهشگران نیز تغییر چندانی در مقـادیر مـاده خشـک و بریکس نوشیدنی مشاهده ننمودند، هرچند کاهش معنـی‌داری در pH نوشیدنی پاپایا طی مدت نگهداری (5/3 به 4/9) گزارش نمودنـد. در مطالعه‌ای دیگر، Jaworska و همکاران (2014) نیز پـس از 12 مـاه نگهداری نکتار انگور فرنگی سیاه، تغییرات معنـی‌داری از نظـر مـاده خشک، بریکس و اسیدیته مشاهده ننمودند.

**جدول -6 ماندگاری نوشیدنی پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک بهینه شده لیمویی**

| آزمون | | روز 0 | روز 7 | روز 14 | روز 21 | روز 28 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | غیرپروبیوتیک | 4/84 ±0/01 $^{ns}$ | 4/83 ±0/01 $^{ns}$ | 4/82±0/01 $^{ns}$ | 4/81±0/04 $^{ns}$ | 4/82±0/04$^{ns}$ |
| | پروبیوتیک | 4/81±0/02$^{a}$ | 4/63±0/02$^{b}$ | 4/57±0/02$^{c}$ | 4/49±0/01$^{d}$ | 4/42±0/02$^{e}$ |
| مواد جامد محلول (Bx) | غیرپروبیوتیک | 12/40 ±0/1$^{ns}$ | 12/43 ±0/05$^{ns}$ | 12/40 ±0/00$^{ns}$ | 12/36±0/05$^{ns}$ | 12/40±0/1$^{ns}$ |
| | پروبیوتیک | 12/26 ±0/05$^{ns}$ | 12/26 ±0/05$^{ns}$ | 12/20 ±0/00$^{ns}$ | 12/23±0/05$^{ns}$ | 12/16 ±0/05$^{ns}$ |
| ماده خشک (%) | غیرپروبیوتیک | 13/21 ±0/02$^{ns}$ | 13/23 ±0/09$^{ns}$ | 13/23 ±0/06$^{ns}$ | 13/23±0/05$^{ns}$ | 13/25 ±0/05$^{ns}$ |
| | پروبیوتیک | 13/19 ±0/05$^{ns}$ | 13/18 ±0/03$^{ns}$ | 13/24 ±0/07$^{ns}$ | 13/22±0/05$^{ns}$ | 13/19±0/07$^{ns}$ |

## آزمون فنـل کـل، ویتـامین C و خاصـیت آنتـی‌اکسـیدانی در نوشیدنی های پروبیوتیک

نتایج نشان داد کـه مقـادیر فنـل کـل، ویتـامین C و خاصـیت آنتی‌اکسیدانی (بر مبنای ترولکس و بر مبنای تقلیل قدرت آهن II) در طول نگهداری کاهش معنی‌داری یافتند. میزان فنل کـل در ابتـدای زمان نگهداری 20/13 mg/100g ثبت گردید که پـس از 21 روز بـه 11/76 کـــاهش و ســـپس در انتهـــای زمـــان نگهـــداری بـــه 12/98 mg/100g افزایش یافت. دلیل اصلی افـزایش کـاذب میـزان فنل در انتهای دوره نگهداری احتمالاً به‌علت به‌وجـود آمـدن برخـی ترکیبات واکنش‌دهنده با معرف فولین است (Piljac-Zegarac *et al*,

Klimczak *et al*, 2007 .,2009). خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط ترولکس و تقلیل قدرت آهن II به ترتیب از میزان 1/11 و 2/53 µmol/g طی 28 روز نگهداری به 0/82 و 1/79 µmol/g کاهش یافت. با توجه به رابطه مستقیم بین میزان ترکیبات فنولیک، آنتوسیانین، ویتامین C و قدرت آنتی‌اکسیدانی( Su and Chien, 2007)، همچنین کاهش این ترکیبات در طی نگهداری، طبیعتاً قدرت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی طی مدت نگهداری کاهش یافت. در نتایجی مشابه، Gironés-Vilaplana و همکاران (2012a) در تحقیقی در مورد تولید آب میوه مخلوط لیمو و توت ماکی[2] کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای DPPH و OH را در مدت 70 روز نگهداری در دو دمای نگهداری 4 و 25 °C گزارش نمودند. Gironés-Vilaplana و همکاران (2012b) نیز کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی توت گلوگیر سیاه[3] و لیمو را در طی نگهداری گزارش کردند. Wojdyło (2009) در تحقیقی در مورد تولید آب‌میوه مخلوط انگور سیاه و سیب گزارش نمود که در مدت یک ماه نگهداری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ABTS به میزان 39-22 درصد کاهش می یابد. همچنین طی 28 روز نگهداری میزان ویتامین C نمونه‌ها کاهش معنی‌داری یافت و از 17/26 به 8/33 mg/100 تقلیل پیدا کرد. نرخ کاهش قابل توجه ویتامین C طی مدت نگهداری در مقالات مختلف متفاوت گزارش گردیده است که علت آن می‌تواند به دلایل مختلفی همانند تفاوت در میزان دمای نگهداری، میزان اکسیژن، دسترسی به نور، نوع میوه و ترکیب شیمیایی نوشیدنی باشد ( Kabasakalis *et al*, 2000., Özkan *et al*, 2004). Miller و Rice-Evans (1997) نیز40 درصد کاهش ویتامین ث در آب پرتقال بعد از 24 ساعت نگهداری در شرایط اکسیداتیو را مشاهده کردند. در پژوهشی-Piljac Zegarac و همکاران (2009)، با بررسی نوشیدنی‌های زغال‌اخته، توت فرنگی و گیلاس گزارش نمودند که میزان ویتامین C در این نوشیدنی‌ها بعد از 7 روز نگهداری در یخچال، در زغال‌اخته حدود 50 درصد و در توت فرنگی و گیلاس 35 تا 58 درصد کاهش می‌یابد.

**آزمون‌های حسی**

خواص حسی نوشیدنی‌های غیرپروبیوتیک و پروبیوتیک لیمویی (به‌جز ویژگی رنگ نوشیدنی غیرپروبیوتیک) در طول 28 روز نگهداری کاهش معنی‌داری پیدا کرد (جدول 8). امتیاز رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی غیرپروبیوتیک به ترتیب از 4/26، 4/03، 3/93، 4/05 و 4/13 در روز 0 به مقادیر 4/06، 3/71، 3/80، 3/75 و 3/83 در روز 28 کاهش یافت. همچنین امتیاز رنگ، بو، مزه، پس مزه و پذیرش کلی نوشیدنی پروبیوتیک به ترتیب از 4/33، 4، 4/03، 4/04 و 4/13 در روز صفر به مقادیر 3/87، 3/7، 3/75، 3/56 و 3/85 در روز 28 کاهش یافت. دلایل متنوعی برای کاهش ویژگی‌های حسی در طول نگهداری ارائه شده است. از مهمترین دلایل می‌توان به فعالیت پروبیوتیک‌ها و تولید ترکیبات جدید، برهمکنش بین ترکیبات نوشیدنی به‌ویژه ترکیبات پروتئینی تراوه و مواد پکتیکی کنسانتره در نوشیدنی‌های پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک اشاره نمود ( Cliff, *et al*, 2013). لازم به ذکر می‌باشد که همه نوشیدنی‌ها پس از 28 روز نگهداری از کیفیت حسی و مقبولیت بالایی برخوردار بودند (جدول 8).

محبی و نجفی (1383) با انجام ارزیابی‌های حسی نوشیدنی‌های میوه‌ای بر پایه آب پنیر مشاهده نمودند که تأثیر مدت زمان نگهداری، دمای نگهداری و اثر متقابل زمان و دمای نگهداری (P<0.01) بر طعم، رنگ و ظاهر پذیرش کلی نوشیدنی معنی‌دار می باشد. Bayarri و همکاران (2001) نیز با بررسی تأثیر مدت زمان نگهداری بر نوشیدنی‌های با طعم پرتقال، کیوی و هلو کاهش معنی‌داری را در فاکتورهای حسی گزارش نمودند. درهرحال برخلاف این نتایج Majumdar و همکاران (2011) تغییرات معنی‌داری در ویژگی‌های حسی نوشیدنی‌های مخلوط میوه و سبزیجات (آب‌لیمو، کدوقلیانی[4] و برگ ریحان[5]) طی 6 ماه زمان نگهداری مشاهده ننمودند.

**آزمون‌های میکروبی**

شکل 1 روند تغییرات شمارش باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LA5) در نوشیدنی‌های پروبیوتیک در طول نگهداری در یخچال را نشان می‌دهد. تعداد اولیه این باکتری در روز اول نگهداری 9/81log cfu/ml تعیین گردید.

با وجود کاهش 2/86 سیکل لگاریتمی طی مدت 28 روز نگهداری در دمای یخچال، بقای این باکتری (6/95 log cfu/ml) بالاتر از حد استاندارد بین‌المللی تعریف شده توسط IDF[6] بود (Floch, 2014). براساس این استاندارد، محصولات پروبیوتیک برای تأثیر بر سلامتی و عملکرد مطلوب حداقل باید دارای $10^6$ باکتری پروبیوتیک زنده بر حسب گرم محصول در زمان مصرف باشند. محققین دیگر نتایج مشابهی را در مورد تعداد بالای پروبیوتیک‌ها ($>10^6$) پس از پایان مدت زمان نگهداری ارئه نموده اند ( Dragalic *et al*, 2005, Marhamatizadeh et al, 2012, Prasanna *et al*, 2014., Di Lena *et al*, 2015). Mortazavian و همکاران (2007)، اثر سرما بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک را بررسی کرده و نشان دادند، بالاترین زنده مانی را *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پس از 20 روز در دمای سردخانه (4°C) دارا بود. Saccaro و همکاران (2009) کاهش دو سیکل لگاریتمی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* را در

2 Maqui berry
3 Black chokeberry
4 Bottle gourd
5 Basil Leaves
6 International Dairy Federation

ماست پروبیوتیک طی مـدت نگهـداری گـزارش کردنـد. در هرحـال برخلاف این نتایج، Rybka و Kailasapathy (1997) در مطالعه‌ای کاهش شدید بـاکتری‌هـای *لاکتوباسـیوس اسـیدوفیلوس* را در یـک ماست پروبیوتیک تجاری طـی مـدت نگهـداری در دمـای یخچـال گزارش نمودند.

نتایج آزمون‌های میکروبی نیز نشان‌دهنده عدم وجـود کلنـی در کشت کلی، کلی فرم و کپک و مخمر در نمونه‌های نگهداری شده در دمای سردخانه تا پایان هفته 4 بود که دلیل این امـر را مـی‌تـوان بـا اعمال فرآیند حرارتی نوشیدنی‌ها مرتبط دانست.

**جدول 7- ارزیابی فنل کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ویتامین C نوشیدنی پروبیوتیک لیمویی بر پایه تراوه**

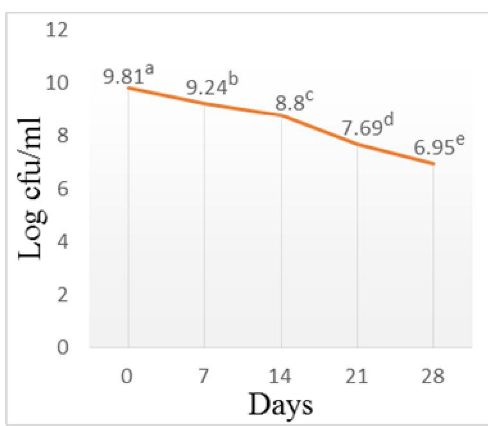
| آزمون | روز 0 | روز 7 | روز 14 | روز 21 | روز 28 |
|---|---|---|---|---|---|
| فنل کل (mg/100 g) | 20/13±0/05$^{a}$ | 18/78±0/05$^{b}$ | 14/41±0/05$^{c}$ | 11/76±0/1$^{d}$ | 12/98±0/00$^{c}$ |
| ترولکس(μmol/g) | 1/11±0/04$^{a}$ | 1/03±0/03$^{b}$ | 1/05±0/06$^{c}$ | 0/93±0/11$^{d}$ | 0/82±0/03$^{e}$ |
| Frap (μmol/g) | 2/53±0/05$^{a}$ | 2/43±0/05$^{b}$ | 2/12±0/05$^{c}$ | 2/01±0/05$^{d}$ | 1/79±0/05$^{e}$ |
| ویتامین C (mg/100 g) | 17/26±0/05$^{a}$ | 15/32±0/05$^{b}$ | 13/25±0/11$^{c}$ | 10/37±0/05$^{d}$ | 8/32±0/05$^{d}$ |

حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (p =0/05) در هر سطر می باشد.

**جدول -8 ارزیابی حسی نوشیدنی لیمویی بهینه تولید شده برپایه تراوه**

| آزمون | | روز 0 | روز 7 | روز 14 | روز 21 | روز 28 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| رنگ | غیرپروبیوتیک | 4/26±0/05$^{a}$ | 4/26±0/05$^{a}$ | 4/23±0/05$^{a}$ | 4/2±0/00$^{a}$ | 4/06±0/05$^{b}$ |
| | پروبیوتیک | 4/33$^{a}$±0/05$^{a}$ | 4/33$^{a}$±0/05$^{a}$ | 4/26$^{a}$±0/05$^{a}$ | 4/06$^{b}$±0/05$^{b}$ | 3/85$^{c}$±0/1$^{c}$ |
| بو | غیرپروبیوتیک | 4/03±0/05$^{ab}$ | 4/06±0/05$^{a}$ | 4/03±0/05$^{ab}$ | 3/93±0/05$^{bc}$ | 3/71±0/05$^{c}$ |
| | پروبیوتیک | 4/00 ±0/00$^{a}$ | 3/96±0/11$^{ab}$ | 3/86±0/05$^{bc}$ | 3/8±0/00$^{cd}$ | 3/7±0/05$^{d}$ |
| مزه | غیرپروبیوتیک | 3/93±0/05$^{a}$ | 3/93±0/05$^{a}$ | 3/93±0/05$^{a}$ | 3/90±0/00$^{a}$ | 3/80±0/1$^{b}$ |
| | پروبیوتیک | 4/03±0/1$^{a}$ | 4/00±0/00$^{a}$ | 3/96±0/05$^{a}$ | 3/86±0/05$^{a}$ | 3/75±0/05$^{b}$ |
| پس مزه | غیرپروبیوتیک | 4/05±0/05$^{a}$ | 4/06±0/05$^{a}$ | 4/03±0/05$^{ab}$ | 3/93±0/05$^{bc}$ | 3/75±0/05$^{c}$ |
| | پروبیوتیک | 4/04±0/1$^{a}$ | 3/96±0/2$^{a}$ | 4/00±0/1$^{a}$ | 3/73±0/05$^{b}$ | 3/56±0/05$^{b}$ |
| پذیرش کلی | غیرپروبیوتیک | 4/13 ±0/05$^{a}$ | 4/13±0/05$^{a}$ | 4/10±0/00$^{a}$ | 3/93±0/05$^{b}$ | 3/83±0/05$^{c}$ |
| | پروبیوتیک | 4/13±0/05$^{a}$ | 4/10±0/00$^{a}$ | 4/00±0/00$^{b}$ | 3/93±0/05$^{b}$ | 3/83±0/05$^{c}$ |

حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p =0/05) در هر سطر می باشد.

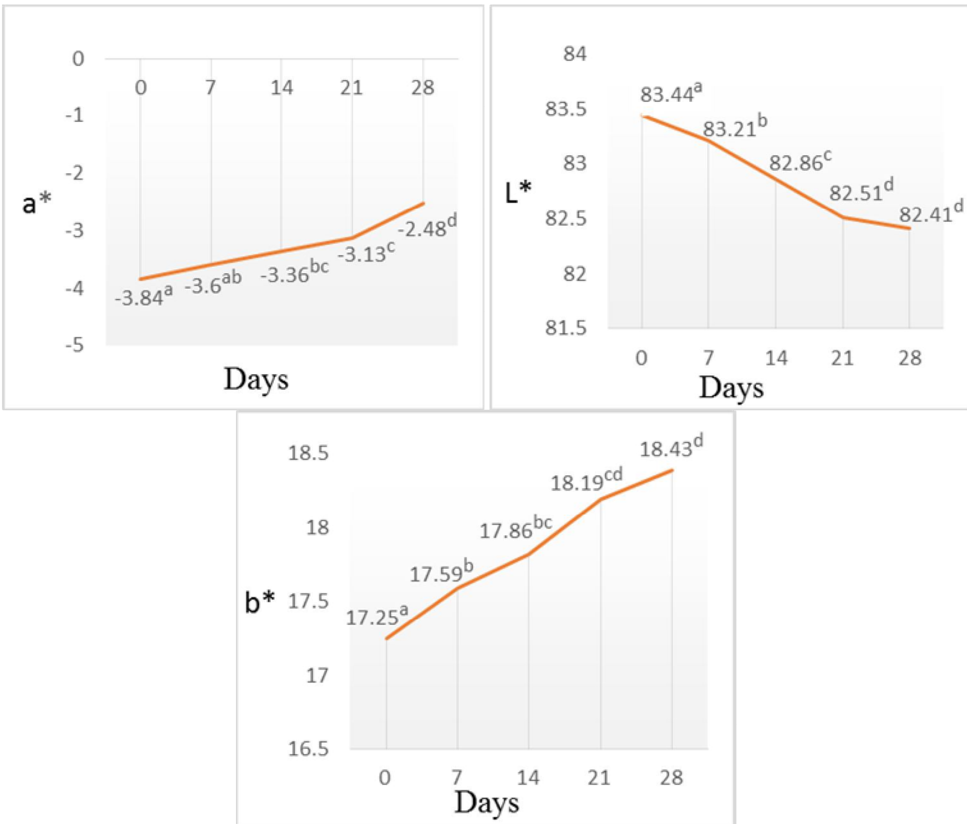



**شکل 1- بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول نگهداری نوشیدنی لیمویی پروبیوتیک**

**آزمون رنگ در نوشیدنی لیمویی پروبیوتیک بر پایه تراوه**

برای بررسی میزان تغییرات ایجاد شده در ویژگی‌های رنگی مواد غذایی از اصلاح پارامترها یا شاخص‌های رنگی استفاده می‌شود. نتایج تجزیه واریانس در شکل 2 نشان داده شده است. بررسی نتایج آزمون

رنگ در نوشیدنی با طعم لیمو نشان می‌دهد که در اثر نگهداری نوشیدنی فاکتور *a و *b افزایش یافته و فاکتور*L نیز کاهش می‌یابد که دلیل آن تجزیه یا تغییر رنگدانه‌های موجود در نمونه‌های غذایی است (Koca *et al*, 2003). Sharma و همکاران (2004) با بررسی تأثیر دما و میزان قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی بر خواص فیزیکوشیمیایی کنسانتره لیمو در طول نگهداری 9 ماهه گزارش نمودند که با گذشت زمان نگهداری میزان قهوه‌ای شدن افزایش و مقادیر قند، آسکوربیک اسید، آمینواسید، فنل و کیفیت رنگ نوشیدنی کاهش می یابد. Martín-Diana و همکاران (2009) نیز کاهش رنگ آب‌میوه طی مدت زمان نگهداری را به تەنشین شدن ذرات ناپایدار و همچنین تجزیه رنگدانه‌ها از جمله آنتوسیانین‌ها نسبت دادند.




**شکل 2- تأثیر زمان نگهداری بر مقادیر ویژگی‌های رنگ *L، * a و * b نوشیدنی لیمویی پروبیوتیک**

## نتیجه‌گیری

با وجود کاربرد متعدد تراوه در صنایع مختلف به‌ویژه صنایع غذایی و دارویی، بخش قابل توجهی از تراوه بویژه در مناطقی که امکان فراوری آن وجود ندارد به فاضلاب راه پیدا می کند که این امر سبب بروز مشکلات زیست محیطی فراوان می‌گردد. بنابراین با تبدیل تراوه تازه به محصولاتی نظیر نوشیدنی‌های پروبیوتیک به روشی ساده می‌توان از هدر رفت این محصول با ارزش جلوگیری نمود و فراورده‌ای ارزان قیمت با خواص تغذیه‌ای بالا را در اختیار عموم مصرف‌کنندگان قرار داد. برای این منظور تحقیق حاضر در دو مرحله انجام پذیرفت و پس از بهینه سازی فرمولاسیون نوشیدنی لیمویی به روش سطح پاسخ، محصول به شکل پروبیوتیک تولید گردید و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی آن طی مدت 4 هفته نگهداری در دمای یخچال ارزیابی گردید. نتایج مرحله اول حاکی از تأثیر معنی‌دار متغیرها (تراوه، آب و کنسانتره) بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، بریکس و ماده خشک) و ویژگی‌های حسی (مزه، بو، پس مزه، رنگ و پذیرش کلی) بود. نتایج حاصل از بهینه‌سازی با طرح مرکب مرکزی نشان داد که بهترین خصوصیات زمانی حاصل می‌شود که فرمولاسیون نوشیدنی شامل 50/63 ml آب، 30 ml تراوه و 10/67 g کنسانتره لیمو باشد. در مرحله دوم، نوشیدنی بهینه به دو شکل پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک تولید شد و ویژگی‌های

فیزیکوشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، خواص حسی و کیفیت میکروبی آن طی 28 روز نگهداری بررسی گردید. تغییرات ماده خشک و بریکس نوشیدنی در طی نگهداری معنی‌دار نبود اما امتیازات حسی و pH در طی نگهداری کاهش یافت. نوشیدنی لیمویی تهیه شده پس از تولید حاوی 20/13 mg/100g فنل کل، 1/11 µmol/g خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب ترولکس و 2/53µmol/g بر حسب آهن II (Frap) و 17/26 mg/100g ویتامین C بود. مقادیر فنل، ترولکس، Frap و ویتامین C پس از 28 روز نگهداری به‌ترتیب 35/5، 26/12، 29/24 و 51/79 درصد کاهش نشان داد. نتایج ارزیابی آزمون رنگ نیز بیانگر افزایش فاکتور *a، *b و کاهش فاکتور*L طی مدت نگهداری بود. با این وجود نوشیدنی پروبیوتیک لیمویی از کیفیت حسی و میکروبی بالایی در پایان مدت 28 روز نگهداری برخوردار بود و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آن 6/95 log cfu/ml و بیش از حد استاندارد تعریف شده برای محصولات پروبیوتیک ($>10^6$ cfu/ml) بود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد می‌باشد و نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان بابت حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع


جوکار، ا.، گلمکانی، م.، کرباسی، ا.، 1385، نوشیدنی شکلاتی تهیه شده از شیر، تراوه شیر فراپالیده و شهد خرما. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، 10(4)، 433-427.

محبی، م.، و نجفی، م. ب. ح.، 1383، بهینه سازی شرایط تولید، ماندگاری و کیفیت نوشیدنی میوه ای آب پنیر، مجله علوم و صنایع کشاورزی، 18(2)، 1-10.

AOAC., 2005, Official Methods of Anaiysis. 14th ed., Association of Official Analytical Chemists.

Bayarri, S., Calvo, C., Costell, E. & Durán, L., 2001, Influence of storage on sensory evaluation of fruit drinks. *Food Science and Technology International*, 7(5), 399-404.

Beucler J., Drake, M. & Foegeding, E.A., 2005, Design of a beverage from whey permeate. *Journal of Food Science*, 70(4), S277-S285.

Bylund, G., 2003, Dairy processing handbook, Lund: *Tetra Pak Processing Systems* AB, 9-12.

Cesar, R.S., Jose, A.S., Carol, H.C. & Pedro, L.O., 1999, Ascorbic Acid as a Standard for Iodometric Titrations. An Analytical Experiment for General Chemistry. *Journal of Chemistry Education*, 76 (10), 121-125.

Cliff, M.A., Fan, L., Sanford, K., Stanich, K., Doucette, C. & Raymond, N., 2013, Descriptive analysis and early-stage consumer acceptance of yogurts fermented with carrot juice. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4160-4172.

Di Lena, M., Quero, G. M., Santovito, E., Verran, J., De Angelis, M., & Fusco, V., 2015, A selective medium for isolation and accurate enumeration of Lactobacillus casei-group members in probiotic milks and dairy products. *International Dairy Journal*, 47, 27-36.

Dragalic,I.,Tratnik, L., & Bozanic, R., 2005, Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. Lait INRA, EDP Sciences, 85(1), 171-179.

Floch MH, 2014, Recommendations for Probiotic Use in Humans. *Pharmaceuticals***,** 7(10), 999-1007.

Garcia, H., Hernandez, A., Robles, V., Angulo, J. O., & De La Cruz-Medina, J., 2002, Preparation of a whey-based probiotic product with Lactobacillus reuteri and Bifidobacterium bifidum. In 2002 Annual Meeting and Food Expo-*Anaheim*, California.

Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A., 2012a, A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. LWT-*Food Science and Technology*, 47(2), 279-286.

Gironés-Vilaplana, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., Moreno, D. A., & García-Viguera, C., 2012b, Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food chemistry*, 134(4), 2090-2096.

Holsinger, V. H., Posati, L. P., & DeVilbiss, E.D., 1974, Whey beverages: A review. *Journal of Dairy Science*, 57(8), 849-859.

İçier, F., Gündüz, G. T., Yılmaz, B., & Memeli, Z., 2015, Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. LWT-*Food Science and Technology*, 63(1), 57-64.

Jaworska, G., Pogoń, K., Klimek, M. & Gwóżdź, E., 2014, Quality changes of blackcurrant nectar under different storage conditions. *Journal of Life Sciences Research*, 1(1), 16-20.

Kabasakalis, V., Siopidou, D. & Moshatou, E., 2000, Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70(3), 325-328.

Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M. & Gliszczyńska-Świgło, A., 2007, Effect of storage on the content of

polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of lemon juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 313-322.

Koca, N., Burdurlu, H.S. & Karadeniz, F., 2003, Kinetics of nonenzymatic browning reaction in citrus juice concentrates during storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27, 353–360.

Kop-Hoolihan, L., 2001, Prophylactic and therapeutic role of probiotics: A review. *Journal of the American Dietetic Association***,** 101(2), 229-41.

Krishnaiah, N., Reddy, C.R., Sastry, P.M. & Rao, M.R., 1989, Studies on the keeping quality of whey beverage. Asian *Journal of Dairy Research*, 42(1), 97-102.

Leiva, M.H.L. & Guzman, M., 1995, Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*, 30(8), 757-762.

Majumdar, T.K., Wadikar, D.D., Vasudish, C.R., Premavalli, K.S. & Bawa, A.S., 2011, Effect of storage on physico-chemical, microbiological and sensory quality of bottlegourd-basil leaves juice. *American Journal of Food Technology*, 6(3), 226-234.

Marhamatizadeh, M , H., Ehsandoost, E., Gholami, P., Moshiri, H., & Nazemi, M., 2012, Effect of permeate on growth and survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic nutritive beverages. *World Applied Sciences Journal*, 18(10), 1389-1393.

Martín-Diana, A.B., Rico, D., Barat, J.M. & Barry-Ryan, C., 2009, Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 590-600.

Meilgaard, M.C., Carr, B.T., & Civille, G.V., 2006, *Sensory Evaluation Techniques*. CRC press.

Miller, N.J. & Rice-Evans, C.A., 1997, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60, 331–337.

Mohamed, A.G., Abbas, H.M. & Zayan, A.F., 2014, Physicochemical and Microbiological Properties of Papaya Functional Beverages Based on Sweet Cheese Whey. *Life Science Journal*, 11(3), 257-263.

Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S. & Reinheimer, J.A., 2007, Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 123-127.

Özkan, M., Kırca, A. & Cemeroğlu, B., 2004, Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food chemistry*, 88(4), 591-597.

Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N. & Bunko, K., 2007, Bioutilisation of permeat for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14.

Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F. & De Valdez, G.F., 2010, Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1), 73-81.

Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Martinez, S. & Belščak, A., 2009, Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 113(2), 394-400.

Prasanna, P.H.P., Grandison, A.S. & Charalampopoulos, D., 2014, Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*, 55, 247-262.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.

Rybka, S. & Kailasapathy, K., 1997, Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. *Milchwissenschaft*, 52(7), 390-394.

Saccaro, D.M., Tamime, A.Y., Pilleggi, A.L.O. & Oliveira, M.N., 2009, The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 C. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 397-404.

Sampedro, F., Geveke, D.J., Fan, X., Rodrigo, D. & Zhang, Q.H., 2009, Shelf-life study of an orange juice–milk based beverage after PEF and thermal processing. *Journal of Food Science*, 74(2), 107-112.

Sanders, M.E., 2003, Probiotics: considerations for human health. Nutrition Reviews-Washington, 61(3), 91-100.

Sharma, S.K., Kausha, B.B.L. & Sharma, P.C., 2004, Effect of temperature and removal of amino acids on non-enzymatic browning of lemon juice concentrates during storage. *Journal of Scientific and Industrial* Research, 63, 444-451.

Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F. & Kaul, V.K., 2013, Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2), 103-113.

Singleton, V.L. & Rossi, J.A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. & Kaul, P., 2007, Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101(4), 1484-1491.

Sodini, I., Mattas, J. & Tong, P.S., 2006, Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. *International Dairy Journal*, 16(12), 1464-1469.

Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. & Li, H.B., 2010, Total phenolic contents and antioxidant

capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362-2372.

Su, M.S. & Chien, P.J., 2007, Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104(1), 182-187.

Wojdyło, A., 2009, Effects of blackcurrant and apple mash blending on the phenolic contents, antioxidant capacity, and colour of juices. Czech *Journal of Food Sciences*, 27(5), 338-351.

Yam, K.L. & Papadakis, S.E., 2004, A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1), 137-142.

Ye, A., Edwards, P.J.B, Gilliland, J., Jameson, G.B. & Singh, H., 2012, Temperature-dependent complexation between sodium caseinate and gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 26, 82-88.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 830-843

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 843-830

# Optimization and investigation on physicochemical, sensory and microbial quality of permeate-based probiotic lemon beverage

**R. A. Khamirian[1], H. Jooyandeh[2*], J. Hesari[3], H. Barzegar[4]**

Received: 2015.11.21
Accepted: 2016.02.27

**Introduction:** Nowadays an increasing demand for whey products particularly whey protein concentrate (WPC) and whey protein Isolate (WPI) resulted in considerable amount of permeates production, which its rejection causes environmental pollution. The bioconversion of whey and permeate is an appealing procedure regarding to human nutrition, particularly for its functional properties. Functional foods are foodstuffs, which have specific functions in the human, resulting health benefits besides energy and nutrients. Fermented dairy products containing probiotic bacteria are group of functional foods, which have received increasing attention in recent years, including the development of the market with large commercial and research interests. Production of probiotic beverages from permeate could be considered as a simple solution to prevent permeate rejection and produce an economical product with appropriate functional properties. Definitely, dairy products are the foremost vehicle for probiotic supplementation. However, other nondairy probiotic products such as fruit and vegetable juices have been shown to afford health benefits. Therefore, the aim of this study was optimizing formulation of permeate-based lemon juice beverage and producing probiotic beverage from optimized beverage.

**Materials and methods:** Based on primary experiments, lemon juice beverages containing permeate were produced with different concentrations of water (19.77, 30, 45, 60, and 70.22 ml), permeate (12.95, 30, 55, 80 and 97.04 ml) and *LEMON* juice concentrate (5.95, 8, 11, 14, and 16.04 g). To estimate the impact of these independent variables and determination of optimized sample (non-probiotic beverage), response surface methodology (RSM) founded on central composite design (CCD) was applied. According to CCD design, 20 tests with six replicates as the center points were performed. Quadratic polynomial model were considered for the relationship between the predicted responses with the independent variables. The optimization was performed based on physicochemical (pH, acidity, total solids and brix) and sensory (taste, color, odor, after taste and total acceptability) characteristics of beverage samples. At the second stage, the best sample was inoculated with *Lactobacillus acidophilus* (La5) and its physicochemical properties, antioxidant capacity, sensory attributes and probiotic cell count were monitored during a 28-day storage period under refrigerator temperature (4°C).

**Results and discussion:** The results showed that all fixed factors, i.e. amount of water, permeate and lemon juice concentrate, had significant impacts on the physicochemical and sensory properties of lemon juice-permeate beverages. By increasing the amount of water up to 45 ml, permeate up to 55 ml and lemon juice concentrate up to 11 g in the formulation, the taste, after taste and total acceptability scores were significantly ($p<0.05$) increased while addition of these components at the higher levels were adversely reduced the sensory attributes of lemon beverages. Also, as the amount of water and permeate enhanced, the values of acidity, brix, total solids, odor and total acceptability were decreased and pH increased. The determination coefficients ($R^2$) and the adjusted determination coefficients (adj- $R^2$) for all the characteristics except color were above 0.9. This revealed that the model was valid and the fitted model could explain more than 90 percent of the variation. Furthermore, correlation between the experimental values and predicted values were significant. Based on RSM results, formulation of *LEMON* juice was optimized based on 50.63 ml water, 30ml permeate and 10.67 g lemon juice concentrate, respectively. During storage at standard chiller temperature (4°C), the pH values and sensory scores of lemon-permeate beverage samples was decreased, but brix and dry matter didn't changed significantly ($p>0.05$). Furthermore, the amount of total phenolic compounds, Trolex, Frap and vitamin C of probiotic permeate lemon juice at the beginning of storage were recorded as 20.13mg/100 g, 1.11μmol/g, 2.53 μmol/g and 17.26 mg/100g, respectively. However, after 28 days storage all these values reduced significantly ($p<0.05$) and

1, 2 and 4. MSc student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz
(∗ Corresponding author: hosjooy@yahoo.com)

reached to values 12.98 mg/100 g for total phenol, 0.82 μmol/g for Trolex, 1.79 μmol/g for Frap and 8.32 mg/100g for vitamin C. The results related to the color values of lemon beverages showed that during the storage period a* and b* values enhanced while l* value reduced meaningfully ($p<0.05$). This may be due to chemical reactions such as non-enzymatic browning, sedimentation of instable/fine particles and color degradation.

Our study showed that both probiotic and non-probiotic lemon-permeate beverages presented satisfactory acceptability and optimal physicochemical properties at the beginning until the end of 28 days' storage period. Furthermore, although the count of probiotic bacteria, i.e. *lactobacillus acidophilus* La5 in the probiotic lemon beverage during the storage considerably declined (nearly 3 logcfu/ml), but it was nearly still more than minimum count of 7 logcfu/ml recommended by the international legislations. Consequently, by utilization of permeate in the formulation of lemon or other probiotic fruit juice beverages, a pleasing functional food with an economical price can be produced.

**Keywords**: Permeate, Probiotic bacteria, Lemon juice beverage, Response surface methodology.